

OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS CON QUITOSÁN MEDIANTE COPRECIPITACIÓN SIMULTÁNEA

Zepeda Tamez, L.A¹.; Iliná, A².; Gregorio Jáuregui, K².

¹ Facultad de Química

Universidad Autónoma de Querétaro

² Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Autónoma de Coahuila

RESUMEN

En el presente estudio se realizó la obtención de nanopartículas magnéticas mediante la precipitación simultánea de magnetita y quitosán en el medio acuoso. Se emplearon las muestras de quitosán de dos marcas comerciales: Sigma-Aldrich (USA) y Coyote Foods (México). Previamente se evaluó el grado de desacetilación de grupos amino de ambas muestras mediante titulación potenciométrica. El porcentaje de coprecipitación de quitosán se monitoreó de acuerdo al método espectrofotométrico de UV/Vis utilizando ninhidrina para la obtención de cromóforo de interés.

INTRODUCCIÓN

El quitosán es un polímero derivado de la quitina, polisacárido formado a partir de monómeros de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucosa. La diferencia radica en que el quitosán no posee acetilaciones, siendo su monómero la 2-amino-2-deoxi- β -D-glucosa. El quitosán y la quitina poseen características como biocompatibilidad, biodegradabilidad y toxicidad nula (Parada y col., 2004), que incrementa el interés para la aplicación de estos polímeros naturales para sustituir a los polímeros sintéticos. La presencia de grupos amino en la estructura de quitosán lo convierte en un biopolímero útil para inmovilización química de las proteínas en presencia de aldehído glutárico como agente bifuncional. El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación enfocado a la obtención de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con quitosán consideradas como el soporte para la inmovilización de fracción proteica de vías respiratorias porcinas enriquecida con los receptores específicos para unión de virus de influenza.

El objetivo del presente trabajo en esta etapa de desarrollo del proyecto fue obtener las nanopartículas magnéticas mediante la precipitación simultánea de magnetita en presencia de diferentes concentraciones de quitosán utilizando dos diferentes muestras comerciales de este biopolímero previamente caracterizadas mediante la titulación potenciométrica y monitoreadas espectrofotométricamente.

EXPERIMENTAL

En los experimentos se utilizaron dos tipos de quitosán: 1) de bajo peso molecular de marca Sigma- Aldrich (USA) y 2) quitosán de marca Coyote Foods (México). Todos los reactivos aplicados en el ensayo fueron de grado analítico.

Titulación potenciométrica

Previo a la aplicación de quitosán en los ensayos de obtención de nanopartículas funcionalizadas se realizó la determinación del contenido de grupos amino, mediante el método descrito por Broussignac (1968). Se utilizó la solución de 0.5 g de quitosán en 20 ml de HCl 0.3 M. el pH de

la solución fue menor a 1. La titulación se realizó monitoreando el pH en el pH-metro (marca Conductometric) adicionando la base NaOH 0.1 M en porciones de 2 ml en la solución de quitosán bajo constante agitación. El ensayo se realizó por duplicado con cada marca de quitosán.

Análisis espectrofotométrico

Se desarrolló una técnica a partir del método reportado por Samejina (1974) para detectar aminos primarias mediante ensayo con ninhidrina. Para la preparación de buffer acetato 4 M (pH 5.5 ± 0.1) se agregaron 32.82 g de acetato de sodio a 50 ml de agua bidestilada agitando la mezcla hasta que se disolvió el acetato de sodio (aprox. 2 h), después se agregaron 24.02 g de ácido acético aforando el contenido hasta los 100 ml con agua bidestilada.

Se disolvieron 0.05 g de quitosán en 50 ml de buffer acetato para obtener una solución de 1000 ppm, a partir de esta solución se prepararon muestras con concentraciones de 20, 50, 100, 200 y 300 ppm. La ninhidrina fue preparada utilizando 0.5 g de ninhidrina en 25 ml de EtOH 70%. Se adicionaron alícuotas de 2.5 ml de cada solución de quitosán en tubos con tapón de rosca y se les agregó 0.5 ml de solución de ninhidrina, se taparon los tubos y se sometieron a agitación en vortex durante 15 s, después fueron colocados en agua a 99-100°C durante 30 min. Las muestras se enfriaron durante 30 minutos más y después fueron leídas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm, utilizando como blanco una solución de 2.5 ml de buffer de acetato con 0.5 ml de ninhidrina. En la Figura 1 se muestran las curvas de calibración obtenidas con el quitosán marca Sigma y Coyote Foods, respectivamente.

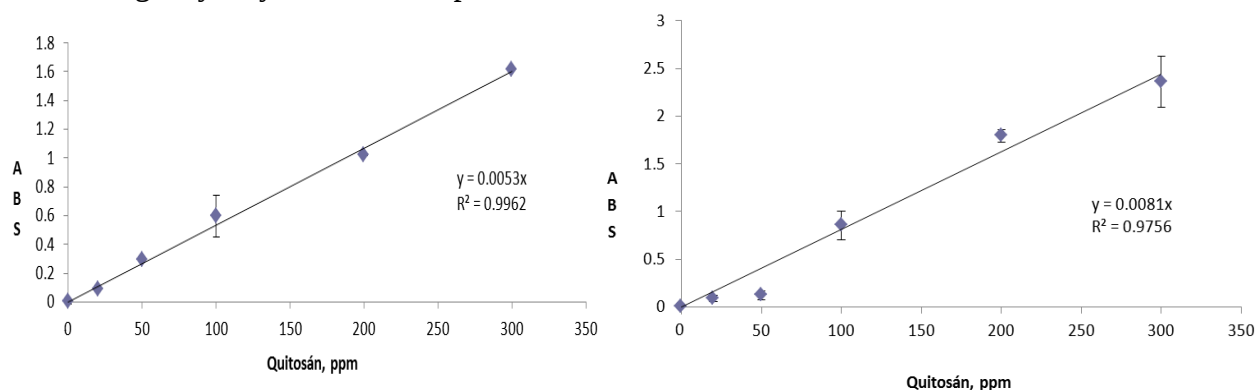


Figura 1. Curvas de calibración, obtenidas con el quitosán marca Sigma (derecha) y marca Coyote Foods (izquierda) mediante el ensayo con ninhidrina. Se muestran la R^2 y las ecuaciones de las funciones lineales correspondientes a cada caso.

Obtención de nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas de magnetita con quitosán fueron preparadas con un método previamente reportado por Hritcu y col. (2008) utilizando diferentes concentraciones de quitosán (0.005 y 0.01 g/ml) de marca Sigma y de marca Coyote Foods para el proceso de coprecipitado. En matraces por separado se prepararon dos soluciones de 100 mL, una de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 M y la otra de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.32 M. Enseguida, se mezclaron en un reactor de 500 mL de vidrio, enchaquetado y provisto con agitación mecánica, se inicia la agitación y se eleva la temperatura a 50 °C. La velocidad de agitación debe ser con la intensidad suficiente como para permitir la integración de las soluciones y una buena distribución del calor suministrado a la mezcla. A la mezcla se agregó el quitosán en cantidad suficiente para obtener la concentración deseada.

Luego, se agregó una solución acuosa de NH_4OH al 25 % p/v. Al iniciar la dosificación la temperatura se mantuvo en 50°C , pero la agitación fue incrementada apreciablemente. Al término de la dosificación se dieron 30 min adicionales de reacción. Las nanopartículas de magnetita fueron recuperadas con magneto. A los sobrenadantes resultado del coprecipitado se les determinó la concentración de quitosán utilizando ensayo con ninhidrina descrito previamente diluyendo las muestras en 25 veces antes de someterlas en la reacción con ninhidrina. La concentración se calculó utilizando la curva de calibración correspondiente a cada caso. El porcentaje de precipitación se calculó considerando concentraciones y volúmenes inicial y final de cada muestra en ensayo.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Titulación potenciométrica

En la Figura 2 se presentan las gráficas de titulación potenciométrica de ambas muestras de quitosán. Se obtuvieron curvas que contienen 2 puntos de inflexión cada una. Los valores de los puntos de inflexión se calcularon a partir de la primera derivada de los datos.

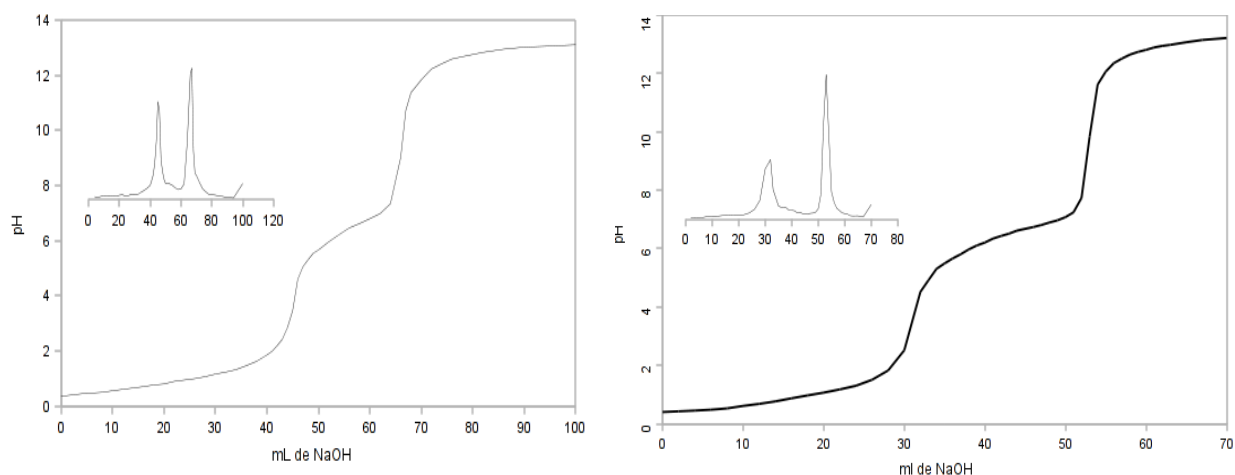


Figura 2. Curvas de titulación para el quitosán de la marca Sigma (derecha) y marca Coyote Foods (izquierda). En la parte izquierda de cada gráfica se muestra la primera derivada, los máximos corresponden a los puntos de inflexión.

La diferencia entre los puntos de inflexión en la curva indica la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosán, y la concentración de éstos se determina mediante la siguiente ecuación por Parada y col. (2004):

$$\text{NH}_2 = \frac{16.1(y-x)f}{w}$$

donde: y es punto de inflexión mayor; x es punto de inflexión menor; f es molaridad de la solución de NaOH; w es peso en gramos de la muestra; 16.1 es valor relacionado al peso equivalente del quitosán.

De acuerdo a la anterior ecuación se cuantificaron porcentajes de grupos amino (Tabla 1): 67.62% y 70.84% para el quitosán de la marca Coyote Foods y para el de la marca Sigma, respectivamente.

TABLA 1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LA PROPORCIÓN DE GRUPOS AMINO DE LAS MUESTRAS DE QUITOSÁN. SE MUESTRA LA MEDIA DE TRES EXPERIMENTOS.

Muestra	Y (ml)	X (ml)	Y-X (ml)	%NH ₂
Quitosán de Coyote Foods	53	32	21	67.62
Quitosán de Sigma	67	45	22	70.84

Se aprecia (Tabla 1) que quitosán de Sigma se caracteriza por un porcentaje de desacetilación ligeramente mayor que la muestra de Coyote Foods. El porcentaje de desacetilación obtenido en el caso del preparado de Sigma fue similar a reportado por Parada y col. (2004) en un estudio realizado.

Análisis espectrofotométrico

El método descrito por Samejina (1974) fue modificado debido a que al aplicarlo en forma reportada en ensayos preliminares no se obtenía la coloración ninguna. Primeramente, para preparar la solución de ninhidrina se utilizó etanol, ya que 1-butanol reportado por Samejina (1974) no se mezcla con agua dificultando la separación de la fase con quitosán. En el buffer de boratos (pH 7) utilizado por Samejina para solubilización de quitosán, no se lograba obtener la solución homogénea de ambas muestras de biopolímero, por lo que se sustituyó por el ácido clorhídrico. Además, la concentración de ninhidrina se elevó en 20 veces en comparación con la técnica original ya que a menor concentración de ésta en la reacción con quitosán no se lograba la formación de cromóforo, a pesar de que en el ensayo patrón realizado con aminoácido leucina, la ninhidrina fue muy efectiva aun a baja concentración (datos obtenidos pero no presentados). Solo después de ajuste de los factores mencionados se logró a obtener las curvas de calibración presentadas en la Figura 1. Las curvas de calibración fueron reproducibles en los ensayos repetidos en diferentes días. Se aprecia que la pendiente de las rectas varía al utilizar quitosán proveniente diferentes marcas comerciales. Esto puede ser relacionado tanto con la diferencia detectada en grado de desacetilación (Tabla 1), como en algunas otras características de biopolímero (como peso molecular, fuente de origen, método de extracción y por lo tanto la presencia de compuestos adicionales, etc.). Los resultados indican que para el monitoreo de la concentración de quitosán se debe utilizarse la curva patrón obtenida con las soluciones madre de biopolímero de cierta marca comercial, el cual se utiliza en el ensayo de interés.

Obtención de nanopartículas magnéticas

La formación de las partículas fue apreciada en forma visual comprobando sus propiedades magnéticas por medio de interacción con el magneto aplicado para la remoción del precipitado del medio de la reacción. Las muestras obtenidas se enviaron para su caracterización en el Centro de Investigación en Química Aplicada (Saltillo). El porcentaje de quitosán removido en el precipitado se presenta en la Tabla 2. Se demostró que una parte de quitosán se une con las partículas de magnetita y la eficiencia del proceso puede ser monitoreada por medio de la técnica espectrofotométrica seleccionada. Se aprecia que al aumentar la concentración de quitosán el porcentaje de remoción disminuye. Esto indica que se tiene un cierto número de sitios de adsorción de biopolímero que se satura a cierta concentración de éste y al aumentar la concentración inicial mayor parte de quitosán se queda en la suspensión sin unirse a las partículas

magnéticas. La mayor coprecipitación se observó en el caso de quitosán de marca Sigma. De tal manera que los ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones, la diferencia puede ser atribuida a las características de los preparados empleados. El porcentaje del quitosán de marca Coyote Foods parece acercarse a la saturación a concentraciones menores que el quitosán de la marca Sigma-Aldrich, esto puede ser atribuido al menor peso molecular de éste último quitosán. Los resultados obtenidos indican que la concentración de quitosán puede ser considerado como un parámetro que puede ser optimizado en los estudios posteriores.

TABLA 2. RESULTADOS DE VALORACIÓN DE REMOCIÓN DE QUITOSÁN DE LA SOLUCIÓN INICIAL DESPUÉS DE LA OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.

Quitosán aplicado en ensayo, g/ml	Porcentaje de remoción de solución inicial,%	
	Con quitosán de Coyote Foods	Con quitosán de Sigma
0.005	6.54	11.65
0.01	3.98	5.75

CONCLUSIONES

Se demostró que quitosán de Sigma se caracteriza por un porcentaje de desacetilación ligeramente mayor que la muestra de Coyote Foods. La técnica de monitoreo de concentración de quitosán con ninhidrina fue instalada en condiciones de laboratorio con ciertas modificaciones y empleada para detección de biopolímero en ensayo de obtención de nanopartículas magnéticas funcionalizadas. Se demostró que una parte de quitosán se une con las partículas de magnetita lo que depende tanto de la concentración inicial de biopolímero como de características del preparado empleado en el ensayo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Broussignac, P., “Haut Polymère Naturel Connue dans l’Industrie: Le Chitosane”, Chimie Industriel Genie, Chimie., 99(9), 1241-1247, **1968**.
- Hritcu, D., Popa, M., Popa, N., Badescu, V. y Balan, V., “Preparation and characterization of magnetic chitosan nanospheres”, Turk. J. Chem., 33, 785-796, **2009**.
- Parada, L. G., Miranda, R. y Katime, I., “Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica”. Rev. Iberoamer. Polím., 5(1), 1-5, **2004**.
- Samejima, K., Dairman, W., Stone, J. y Udenfriend, S. “Condensation of ninhydrin with aldehydes and primary amines to yield highly fluorescent ternary products : II. Application to the Detection and Assay of Peptides, Amino Acids, Amines, and Amino Sugars”. Anal. Biochem., 42, 237-247, **1971**.


 Dra. Anna Iliná

Revisado y aprobado por la investigadora -anfitrión